

## Verfahren zur Herstellung von rekombinanter RNase A

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter  
5 RNase A in *E.coli*, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine DNA-Sequenz  
verwendet wird, die für eine RNase A bovinen Ursprungs kodiert und die an die  
Kodonverwendung in *E.coli* angepasst wurde. Des Weiteren betrifft die Erfindung  
Nukleinsäuremoleküle, die eine Nukleinsäuresequenz enthalten, die an die  
Kodonverwendung in *E.coli* angepasst wurde sowie rekombinante  
10 Nukleinsäuremoleküle, die eines dieser Nukleinsäuremoleküle enthalten und die  
Expression der rekombinanten RNase A in *E.coli* erlauben.

Die RNase A ist eine Endoribonuklease, die RNA-Stränge an innenständigen  
Phosphodiesterbrücken hydrolysiert. Sie ist spezifisch für einzelsträngige RNA und  
15 spaltet Bindungen 3' von Pyrimidinen. Daher bilden sich nach der Spaltung mit  
RNase A Pyrimidin-3'-Phosphate und Oligonukleotide mit terminalen Pyrimidin-3'-  
Phosphaten. Die RNase A besteht aus einer durch vier Disulfidbrücken  
intramolekular vernetzten Kette aus 124 Aminosäuren. Die RNase A ist auch in  
Abwesenheit von Co-Faktoren und zweiwertigen Kationen enzymatisch aktiv. Sie  
20 wird gehemmt durch Schwermetallionen sowie durch DNA in einer kompetitiven  
Weise.

Die RNase A wird in verschiedenen molekularbiologischen Techniken eingesetzt.  
Bei der Isolierung entweder von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen oder von  
25 genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen beispielsweise wird neben der DNA  
auch RNA aufgereinigt, die in großen Mengen zu einer erhöhten Viskosität der Probe  
und zu einer Verringerung der Ausbeute führt. Daher muss die RNA durch Zugabe  
von RNase A abgebaut werden, um die Qualität und Quantität der Probe zu erhöhen.  
Ähnliches gilt auch für die Präparation rekombinanter Proteine.

- 2 -

Eine weitere Anwendung findet die RNase A beim Nachweis von Einzelbasenmutationen in RNA oder DNA. In diesem Fall spaltet die RNase A an Fehlpaarungen beispielsweise in RNA-RNA-Heteroduplexen, die zwischen einer Referenz-Wildtyp-RNA und einer möglicherweise mutierten RNA gebildet wurden.

- 5 Die Größe des gespaltenen Stranges kann anschließend durch Gelelektrophorese abgeschätzt werden.

Schließlich wird die RNase A auch in RNase-Protection-Assays verwendet, mit denen die Expression verschiedener Gene gleichzeitig untersucht werden kann. Diese

- 10 Methode beruht auf der Hybridisierung von Proben-RNAs an komplementäre, radioaktiv markierte RNA-Sonden (Riboprobe) und dem nachfolgenden Verdau von nicht hybridisierten Sequenzen mit einer oder mehreren einzelstrangspezifischen Ribonukleasen. Nach dem erfolgten Verdau werden die Ribonukleasen inaktiviert und die geschützten Fragmente der radioaktiv markierten RNA durch  
15 Polyacrylamidgelelektrophorese und Autoradiographie analysiert.

Die Vielzahl der molekularbiologischen Anwendungsmöglichkeiten für die RNase A erfordert die Isolierung großer Mengen des Enzyms in hoher Reinheit. Der klassische Weg zur Herstellung der RNase A umfasst die Isolierung aus dem Rinderpankreas.

- 20 Allerdings führte die BSE-Problematik der vergangenen Jahre dazu, dass tierische Rohstoffe, insbesondere solche, die aus Rindern stammen, aus Gründen der biologischen Sicherheit von den Behörden in der pharmazeutischen Produktion nicht mehr akzeptiert werden. Deshalb wurde in den vergangenen Jahren ganz auf die Verwendung von RNasen verzichtet und die RNA in vielen biotechnologisch-  
25 pharmazeutischen Verfahren stattdessen durch alternative, meist sehr kostspielige Verfahren wie die Chromatographie abgetrennt.

Daher besteht ein Bedürfnis nach einem Verfahren, das die Herstellung von großen Mengen an RNase A ermöglicht, ohne dass dazu tierisches Material verwendet werden muss. Dies kann vor allem durch die rekombinante Herstellung der RNase A erreicht werden.

5

Die rekombinante Herstellung der RNase A wird allerdings durch vier Faktoren verkompliziert: (1) die RNase A ist instabil, wenn sie alleine in *E.coli* exprimiert wird; (2) um die RNase A zu einem aktiven Protein zu rekonstituieren, müssen vier Disulfidbrücken korrekt gebildet werden; (3) die Expression der RNase A innerhalb  
10 einer Zelle ist möglicherweise zytotoxisch und (4) die RNase A baut möglicherweise ihr eigenes Transkript ab, wodurch die Expressionsleistung entsprechend sinkt.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Möglichkeiten zur rekombinanten Expression der RNase A erprobt, die diese Schwierigkeiten überwinden sollten, die  
15 aber alle zu einer eher geringen RNase A-Ausbeute führten.

In einem Ansatz wurde die RNase A unter der Kontrolle eines hitzeinduzierbaren Promotors exprimiert. Dies führte zur Bildung von Inclusion Bodies und zu einer Ausbeute von etwa 2 mg/l (McGeehan und Brenner (1989) FEBS Letters 247 (1):  
20 55-56).

Die Expression eines Fusionsproteins von RNase A mit einem Gen-10-Protein aus dem Bakteriophagen T7 unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors führte ebenfalls zur Bildung von Inclusion Bodies. Nach enzymatischer Spaltung des  
25 Fusionsproteins mit der Protease Faktor Xa und Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 4-8 mg/l Protein erzielt (Laity et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 615-619).

- 4 -

Auch ein Fusionsprotein aus  $\beta$ -Galaktosidase und RNase A wurde unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren  $\beta$ -Galaktosidase-Promotors in *E.coli* exprimiert. Mit dieser Strategie wurde nach der Aufreinigung eine Ausbeute von 0,2 mg/l erzielt (Nambiar et al. (1987) Eur. J. Biochem. 163: 67-71).

5

Ebenso wurde die RNase A zusammen mit einem Signalpeptid, das die effiziente Translokation der RNase in das Periplasma bewirkt, unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors exprimiert. Die RNase A wurde aus dem Periplasma durch Sphäroplast/osmotischen Schock freigesetzt und aufgereinigt. Mit dieser Strategie  
10 wurde eine Ausbeute von 0,1 mg/l erzielt (Tarragona-Fiol et al. (1992) Gene 118: 239-245).

Schließlich wurde in *E.coli*-Zellen auch eine Kombination aus Hitze-induzierbarem Promotor und einem Signalpeptid, das den Transport der RNase A in das Periplasma steuert, getestet. Auch hier wurden die periplasmatischen Proteine durch  
15 Sphäroplast/osmotischen Schock freigesetzt und aufgereinigt. Mit dieser Methode konnte eine Ausbeute von 45-50 mg/l erreicht werden (Okorokov et al. (1995) Protein Expression and Purification 6: 472-480).

20 Auch andere Wirtszellen als *E.coli*, wie z.B. *Bacillus subtilis* und *Pichia pastoris*, wurden zur Expression der RNase A verwendet. Mit diesen Wirtszellen konnten ebenfalls nur Ausbeuten in der Größenordnung von 1-5 mg/l erreicht werden (Vasanthi und Filpula (1989) Gene 76: 53-60; Chatani et al. (2000) Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(11): 2437-2444).

25

Somit besteht trotz der mehrfachen Versuche zur Optimierung der rekombinanten RNase A-Expression ein Bedürfnis nach einem Verfahren, das die Herstellung von

- 5 -

rekombinanter RNase A in *E.coli* mit einer höheren Ausbeute als im Stand der Technik ermöglicht.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem  
5 rekombinante RNase A in großen Mengen in *E.coli*-Zellen hergestellt werden kann.

Diese und weitere Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Merkmale des Hauptanspruchs gelöst.

10 Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen definiert.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Herstellung rekombinanter RNase A in *E.coli* bereitgestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine RNase A bovinen Ursprungs kodiert und die an die  
15 Kodonverwendung in *E.coli* angepasst wurde.

Der genetische Code ist redundant, da 20 Aminosäuren von 61 Triplet-Kodons spezifiziert werden. Daher werden die meisten der 20 proteinogenen Aminosäuren von mehreren Basentriplets (Kodons) kodiert. Die synonymen Kodons, die eine  
20 einzelne Aminosäure spezifizieren, werden in einem bestimmten Organismus jedoch nicht mit gleicher Häufigkeit verwendet, sondern es gibt bevorzugte Kodons, die häufig verwendet werden, und Kodons, die seltener verwendet werden. Diese Unterschiede in der Kodonverwendung werden zurückgeführt auf selektive  
25 evolutionäre Drücke und vor allem die Effizienz der Translation. Ein Grund für die geringere Translationseffizienz von selten auftretenden Kodons könnte darin liegen, dass die entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Pools erschöpft werden und damit nicht mehr zur Proteinsynthese zur Verfügung stehen.

- 6 -

Außerdem bevorzugen unterschiedliche Organismen unterschiedliche Kodons. Daher läuft beispielsweise die Expression einer rekombinanten DNA, die aus einer Säugerzelle stammt, in *E. coli*-Zellen häufig nur suboptimal ab. Deshalb kann der Austausch selten verwendeter Kodons gegen häufig verwendete Kodons in manchen  
5 Fällen die Expression erhöhen.

Für viele Organismen, von denen die DNA-Sequenz einer größeren Zahl von Genen bekannt ist, gibt es Tabellen, denen man die Häufigkeit der Verwendung bestimmter Kodons in dem jeweiligen Organismus entnehmen kann. Mit Hilfe dieser Tabellen  
10 lassen sich Proteinsequenzen mit relativ großer Genauigkeit in eine DNA-Sequenz zurückübersetzen, die die im jeweiligen Organismus bevorzugten Kodons für die verschiedenen Aminosäuren des Proteins enthält. Tabellen zur Kodonverwendung können u.a. unter den folgenden Internet-Adressen aufgefunden werden:  
<http://www.kazusa.or.jp/Kodon/E.html>;  
15 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/cai.html>;  
<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/chips.html>; oder  
<http://www.entelechon.com/eng/cutanalysis.html>. Auch zur reversen Translation einer Proteinsequenz, beispielsweise der Proteinsequenz der RNase A, in eine degenerierte DNA-Sequenz sind Programme erhältlich, wie etwa unter  
20 <http://www.entelechon.com/eng/backtranslation.html>; oder  
<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/Apps/backtranseq.html>.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wurde die zur Expression der rekombinanten RNase A verwendete DNA-Sequenz an die Kodonverwendung des *E.coli*-Stamms  
25 K12 angepasst.

Die Anpassung der Sequenzen an die Kodonverwendung in einem bestimmten Organismus kann unter Zuhilfenahme verschiedener Kriterien erfolgen. Zum einen

- 7 -

kann für eine bestimmte Aminosäure immer das am häufigsten im ausgewählten Organismus vorkommende Kodon verwendet werden, zum anderen kann aber auch die natürliche Frequenz der verschiedenen Kodons im ausgewählten Organismus berücksichtigt werden, so dass alle Kodons für eine bestimmte Aminosäure  
5 entsprechend ihrer natürlichen Häufigkeit im Genom des ausgewählten Organismus in die optimierte Sequenz eingebaut werden. Dabei kann die Auswahl, an welcher Position welches Basen-Triplett verwendet wird, zufällig stattfinden. Beide Strategien zur Optimierung der DNA-Sequenz im Hinblick auf die Kodonverwendung haben sich für das erfindungsgemäße Verfahren gleichermaßen  
10 als geeignet erwiesen.

Die für die bovine RNase A kodierende DNA-Sequenz ist an mindestens 30 Positionen, bevorzugt an mindestens 40 Positionen, besonders bevorzugt an mindestens 50 Positionen und am meisten bevorzugt an mindestens 60 Positionen in  
15 Bezug auf die Kodonverwendung im *E.coli*-Stamm K12 optimiert.

Am meisten bevorzugt handelt es sich bei den optimierten DNA-Sequenzen um die in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 dargestellten DNA-Sequenzen oder um DNA-Sequenzen, die zu den in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 dargestellten DNA-  
20 Sequenzen zu mindestens 90, bevorzugt zu mindestens 92 oder 94%, besonders bevorzugt zu mindestens 96 oder 98% und am meisten bevorzugt zu mindestens 99% über die gesamte kodierende Sequenz identisch sind.

Die Sequenzidentität wird über eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen  
25 Algorithmen beruhen, bestimmt. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp (Feng und Doolittle (1987) J. Mol.

- 8 -

Evolution 25: 351 – 360; Higgins et al. (1989) CABIOS 5: 151 – 153) oder die Programme Gap und Best Fit (Needleman und Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443 – 453 und Smith und Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 – 489) verwendet, die im GCG-Software-Paket (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA) enthalten sind.

Die oben in Prozent angegebenen Sequenzidentitätswerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10000 und Average Mismatch: 0,000.

Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet.

Ohne an eine Hypothese gebunden sein zu wollen, wird angenommen, dass die kodonoptimierten DNA-Sequenzen eine effizientere Translation ermöglichen und die daraus gebildeten mRNAs möglicherweise eine höhere Halbwertszeit in der Zelle besitzen und daher häufiger für die Translation zur Verfügung stehen.

Eine "RNase A bovinen Ursprungs" weist die im Wesentlichen gleiche Aminosäuresequenz wie das in bovinen Zellen auftretende native Protein auf, wird aber nicht durch die in den bovinen Zellen auftretende DNA kodiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die RNase A in Fusion mit einem Signalpeptid exprimiert, das den Transport in den periplasmatischen Raum steuert. Die Lokalisation im periplasmatischen Raum verhindert mögliche zytotoxische Effekte, die durch die Expression der RNase A auftreten könnten. Beispiele für solche Signalpeptide schließen ein stII und phoA (Denefle et al. (1989) Gene 85:

499-510), ompF und LamB (Hoffman und Wright (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5107-5111), pelB (Lei et al. (1987) J. Bacteriol. 169 (9): 4379-4383), OmpT (Johnson et al. (1996) Protein Expression Purif. 7: 104-113), Beta-lactamase (Kadonaga et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 2149-2154), Enterotoxine LT-A, LT-B (Morioka-Fujimoto et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 1728-1732) und Protein A aus *S. aureus* (Abrahmsen et al. (1986) Nucleic Acids Res. 14: 7487-7500).

Auch verschiedene nicht-natürliche, synthetische Signalsequenzen, die die Sekretion bestimmter Proteine ermöglichen, sind dem Fachmann wohl bekannt.

10

Bevorzugt wird das phoA-Signalpeptid verwendet.

Die Expression der RNase A steht bevorzugt unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Besonders bevorzugt wird ein hitzeinduzierbarer Promotor verwendet, bei dem die Expression des unter seiner Kontrolle stehenden Gens durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 42°C induziert wird.

15

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Bestandteile in 5'-3'-Reihenfolge:

20

- einen in *E. coli* aktiven Promotor,
- ggf. eine für ein Signalpeptid kodierende Sequenz,
- eine an die Kodonverwendung in *E. coli* angepasste DNA-Sequenz, die für eine RNase A bovinen Ursprungs kodiert.

25

Bevorzugt handelt es sich bei dem Promotor um einen induzierbaren Promotor, besonders bevorzugt um einen hitzeinduzierbaren Promotor. Bei dem Signalpeptid handelt es sich bevorzugt um eine Signalsequenz, die den Transport des Proteins in

- 10 -

den periplasmatischen Raum steuert, und besonders bevorzugt um das phoA-Signalpeptid.

- Die Methoden zur Herstellung eines Nukleinsäuremoleküls, das die oben
- 5 aufgeführten Komponenten umfasst, gehören zu den molekularbiologischen Standardmethoden und können der Literatur wie z.B. Sambrook und Russell (2001) Molecular Cloning - A laboratory manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, entnommen werden.
- 10 Die Induktion des Promotors findet bevorzugt Mitte bis Ende der exponentiellen Wachstumsphase statt. Zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen eine Biofeuchtmasse von etwa 35 bis 50 g/l Kulturmedium erreicht. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt für mindestens 14, in der Regel für 14 bis 20 Stunden, bevorzugt für mindestens 16, in der Regel für 16 bis 18 Stunden, und am meisten bevorzugt für
- 15 etwa 17 Stunden.

Als Wirtszellen für die Expression der rekombinanten RNase A eignen sich verschiedene *E.coli*-Stämme, u.a. BL21, BNN93, MM294, ATCC 23226 und ATCC 23851.

- 20 Dem Fachmann sind Methoden bekannt, mit denen er die DNA für die rekombinante Expression der RNase A in die Wirtszellen einbringen kann. Zu diesen Methoden gehören sowohl chemische Methoden als auch physikalische Methoden wie die Elektroporation. Ebenso sind dem Fachmann geeignete Kulturmedien und
- 25 Kulturbedingungen für die *E. coli*-Zellen bekannt. Diese können auch der Literatur, wie z.B. Sambrook und Russell (2001) Molecular Cloning - A laboratory manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, entnommen werden.

Die *E. coli*-Zellkultur in einem geeigneten Kulturmedium enthält bei der Ernte nach der Kultivierung und ggf. Induktion mindestens 0,2 g RNase A pro Liter Kulturmedium, bevorzugt mindestens 0,5 g/l, besonders bevorzugt mindestens 1 g/l  
5 und am meisten bevorzugt etwa 1,2 g RNase A pro Liter Kulturmedium.

In einer bevorzugten Ausführungsform bildet die RNase A in den Wirtszellen Inclusion Bodies. Diese Inclusion Bodies stellen unlösliche intrazelluläre Aggregate des exprimierten Proteins dar. Sie können durch Zentrifugation bei geringer  
10 Geschwindigkeit isoliert werden und bestehen üblicherweise aus fast reinen Ablagerungen von denaturierten Formen des rekombinant exprimierten Proteins. Im Falle der RNase A trägt die Bildung der Inclusion Bodies möglicherweise zu der hohen Ausbeute bei, da das Produkt in einer inaktiven Form vorliegt und somit keine zytotoxischen Wirkungen zeigen kann.

15 Um die Inclusion Bodies freizusetzen, muss die Wirtszelle lysiert werden. Die Lyse der Zelle kann erreicht werden z.B. durch mechanischen Scherstress, enzymatischen Verdau, z.B. mit Lysozym, Ultraschallbehandlung, Homogenisierung, Glaskugelvortexen, Behandlung mit Detergenzien oder organischen Lösungsmitteln,  
20 durch Einfrieren und Auftauen oder durch Behandlung mit einem Denaturierungsmittel (Bollag et al. (1996) Protein Methods, 415 Seiten, Wiley-Liss, NY, NY). Gegebenenfalls können die Zellen in Gegenwart eines Denaturierungsmittels oder eines Disulfid-reduzierenden Mittels lysiert werden. Unlösliches oder aggregiertes Material kann von löslichen Proteinen durch  
25 verschiedene Verfahren, z.B. Zentrifugation, Filtration (einschließlich Ultrafiltration) oder Präzipitation abgetrennt werden.

Im nächsten Schritt muss das unlösliche bzw. aggregierte Material löslich oder monomer gemacht werden, indem es mit einem Denaturierungsmittel behandelt wird. Geeignete Denaturierungsmittel schließen ein: Harnstoff, Guanidin, Arginin, Natriumthiocyanat, pH-Extreme (verdünnte Säuren oder Basen), Detergenzien (z.B. 5 SDS, Sarkosyl), Salze (Chloride, Nitrate, Thiocyanate, Trichloroacetate), chemische Derivatisierung (Sulfitolyse, Reaktion mit Citraconanhydrid), Lösungsmittel (2-Amino-2-methyl-1-propanol oder andere Alkohole, DMSO, DMF) oder starke Anionenaustauschharze wie etwa Q-Sepharose. Geeignete Konzentrationen von Harnstoff sind 1 bis 8 M, bevorzugt 5 bis 8 M. Geeignete Konzentrationen von 10 Guanidin sind 1 bis 8 M, bevorzugt 4 bis 8 M. Besonders bevorzugt wird Guanidin in einer Konzentration von 5 M verwendet.

Besonders bevorzugt enthält der Solubilisierungspuffer zusätzlich ein Redoxgemisch aus einem Oxidationsmittel und einem Reduktionsmittel, um die Reduktion intra- 15 und intermolekularer Disulfidbrücken zu fördern. Beispiele für geeignete Redoxgemische schließen ein Cystein/Sauerstoff, Cystein/Cystin, Cystein/Cystamin, Cysteamin/Cystamin und reduziertes Glutathion/oxidiertes Glutathion. Am meisten bevorzugt enthält der Solubilisierungspuffer reduziertes und oxidiertes Glutathion. Dabei liegt das reduzierte Glutathion in einer Konzentration von 1 bis 10 mM, 20 bevorzugt 2 bis 5 mM, im Solubilisierungspuffer vor. Die Konzentration des oxidierten Glutathions beträgt 1/10 bis 1/1, bevorzugt 1/10, der Konzentration des reduzierten Glutathions.

Der pH-Wert des Solubilisierungsgemisches liegt bevorzugt zwischen pH 6 und pH 25 10, besonders bevorzugt liegt er zwischen 7,5 und 9,5, am meisten bevorzugt bei etwa pH 9.

- Nach dem Solubilisieren der Inclusion Bodies muss das Protein in seine aktive Form zurückgefaltet werden. Dazu muss das Protein seine native Konformation annehmen und seine nativen Disulfidbrücken ausbilden. Die Rückfaltung wird erreicht, indem die Konzentration des Denaturierungsmittels reduziert wird, so dass das Protein in
- 5 seine lösliche, biologisch aktive Form renaturieren kann. Die Konzentration des Denaturierungsmittels kann reduziert werden durch Dialyse, Verdünnung, Gelfiltration, Präzipitation des Proteins oder durch Immobilisierung an einem Harz, gefolgt von Waschen mit einem Puffer. Bevorzugt wird die Konzentration des Denaturierungsmittels durch Verdünnung in einem nativen Puffer reduziert.
- 10
- Um die nativen Disulfidbrücken des Proteins zurückzubilden, wird ein Oxidationsmittel oder ein Redoxgemisch aus einem Oxidationsmittel und einem Reduktionsmittel zugegeben, die die Disulfidaustauschreaktion katalysieren. Geeignete Oxidationsmittel schließen ein Sauerstoff, Cystin, oxidiertes Glutathion,
- 15 Cystamin und Dithioglykolsäure. Beispiele für geeignete Redoxgemische schließen ein Cystein/Sauerstoff, Cystein/Cystin, Cystein/ Cystamin, Cysteamin/Cystamin, reduziertes Glutathion/oxidiertes Glutathion, Natriumsulfit/Natriumtetrathionat usw. Gegebenenfalls kann dem Rückfaltungsgemisch ein Reduktionsmittel wie DTT oder 2-Mercaptoethanol zugegeben werden, um den Disulfidaustausch zu fördern.
- 20 Gegebenenfalls kann ein Metallion wie Kupfer dem Rückfaltungsgemisch zugegeben werden, um die Oxidation des Proteins zu fördern. Geeignete Konzentrationen von Metallionen im Rückfaltungsgemisch sind 1  $\mu$ M bis 1 mM.
- Bevorzugt enthält das Rückfaltungsgemisch reduziertes und oxidiertes Glutathion.
- 25 Dabei liegt das reduzierte Glutathion in einer Konzentration von 1 bis 10 mM, bevorzugt 2 bis 5 mM, im Rückfaltungsgemisch vor. Die Konzentration des oxidierten Glutathions beträgt 1/10 bis 1/1, bevorzugt 1/10, der Konzentration des reduzierten Glutathions.

- 14 -

Bevorzugt beträgt der pH des Rückfaltungsgemisches zwischen pH 6 und pH 10, besonders bevorzugt liegt der pH zwischen 7,5 und 9,5 und am meisten bevorzugt liegt der pH des Rückfaltungsgemisches bei etwa pH 9.

5

Nach der Solubilisierung und Rückfaltung der RNase A wird diese bevorzugt durch chromatographische Schritte weiter aufgereinigt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Chromatographie um eine Kationenaustauschchromatographie, bei der die RNase A bei einem bestimmten pH des Puffers, der mindestens 0,5 bis 1,5 pH-

10 Einheiten unterhalb des pI-Wertes der RNase A von 9,45 liegen sollte, durch ihre positive Gesamtladung an die Matrix der Kationenaustauschsäule bindet, während die meisten kontaminierenden Proteine nicht binden und durch Waschen entfernt werden können.

15 Geeignete Kationenaustauschmatrizes schließen ein Carboxymethyl (CM)-Cellulose, AG 50 W, Bio-Rex 70, Carboxymethyl (CM)-Sephadex, Sulfopropyl (SP)-Sephadex, Carboxymethyl (CM)-Sephadex CL-6B und Sulfonat (S)-Sephadex.

Geeignete Matrizes und Protokolle zur Durchführung der Kationenaustauschchromatographie kann der Fachmann den Produktinformationen von Anbietern wie  
20 Amersham Biosciences (<http://www.amershambiosciences.com>) oder Bio-Rad (<http://www.bio-rad.com>) entnehmen.

Geeignete Puffer für die Kationenaustauschchromatographie schließen ein Maleat-,  
25 Malonat-, Citrat-, Lactat-, Acetat-, Phosphat-, HEPES- und Bicin-Puffer. Die Konzentration des Puffers liegt bevorzugt zwischen 20 mM und 50 mM. Der pH des Puffers sollte für die Aufreinigung der RNase A möglichst nicht höher als 8,0, bevorzugt nicht höher als 7,0 sein.

Besonders bevorzugt wird für die Kationenaustauschchromatographie 20 mM Natriumacetat pH 5,0 oder 50 mM Tris-HCl pH 6,8 verwendet.

- 5 Die RNase A kann nach dem Waschen durch eine Veränderung, im Falle der Kationenaustauschchromatographie eine Erhöhung, des pH-Wertes oder eine Erhöhung der Ionenstärke von der Säule eluiert werden.

- 10 Bevorzugt wird die Elution durch Erhöhung der Ionenstärke bewirkt. Wenn 20 mM Natriumacetat pH 5,0 als Puffer verwendet wird, wird zur Elution ein Gemisch von 20 mM Natriumacetat pH 5,0 und 350 mM NaCl eingesetzt. Wenn 50 mM Tris-HCl pH 6,8 als Puffer verwendet wird, wird zur Elution Tris-HCl pH 6,8 in einer Konzentration von 250 mM eingesetzt.

- 15 Weitere geeignete Bedingungen für die Kationenaustauschchromatographie können der einschlägigen Literatur, wie etwa dem Handbuch "Ion Exchange Chromatography-Principles and Methods" von Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland, entnommen werden.

- 20 Die RNase A kann anschließend durch zusätzliche chromatographische Schritte sowie Filtration, Präzipitation und Diafiltration weiter aufgereinigt werden.

- 25 Nach der Aufreinigung müssen eventuell mit der RNase A aufgereinigte DNasen inaktiviert werden, indem die produkthaltigen Chromatographiefraktionen bei 95 °C im Wasserbad hitzebehandelt werden. Bevorzugt erfolgt die Hitzebehandlung für 20 bis 35 Minuten, besonders bevorzugt für etwa 20 Minuten. Alternativ kann die Hitzebehandlung auch bei 80 °C über einen entsprechend verlängerten Zeitraum erfolgen.

Nach der Aufreinigung kann die RNase A hinsichtlich der Menge und ihrer Aktivität analysiert werden. Die Analyse der Menge der aufgereinigten RNase A kann zum einen qualitativ über eine SDS-PAGE-Analyse und anschließende Coomassie-  
5 Brilliant-Blue-Färbung erfolgen. Zur Quantifizierung der RNase A kann ein kolorimetrischer Assay wie etwa der Bradford-Assay oder eine chemische Reaktion wie die Lowry- oder die Biuret-Reaktion verwendet werden. Als Standard für die Analysen kann eine nicht-rekombinante, kommerziell erhältliche bovine RNase A mit einer bekannten Kombination verwendet werden. Außerdem kann die  
10 Konzentration der Proteinlösung auch über die Extinktion bei 278 nm unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten der RNase A berechnet werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird nach der Aufreinigung eine Ausbeute  
15 an RNase A von mehr als 100 mg/l Kulturmedium, bevorzugt von mehr als 200 mg/l Kulturmedium, besonders bevorzugt von mehr als 250 mg/l Kulturmedium und am meisten bevorzugt von etwa 300 mg/l Kulturmedium erreicht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird nach der Aufreinigung eine Ausbeute  
20 an RNase A von mehr als 3 mg/g Biofeuchtmasse, bevorzugt von mehr als 4 mg/g Biofeuchtmasse, besonders bevorzugt von mehr als 6 mg/g Biofeuchtmasse und am meisten bevorzugt von mehr als 8 mg/g Biofeuchtmasse erreicht.

Die Aktivität der RNase A kann durch Verdau von definierten RNA-Molekülen  
25 bestimmt werden. Die RNase A-Aktivität wird in Kunitz-Einheiten wiedergegeben. Eine Kunitz-Einheit verursacht eine Extinktionsabnahme bei 300 nm von 100 % in einer Minute bei einer Temperatur von 25 °C und einem pH von 5,0, wenn Gesamt-RNA aus Hefe als Substrat verwendet wird. Zum Vergleich der Aktivität der nach

dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigten RNase A mit kommerziell erhältlichen, nicht rekombinanten RNase A-Präparationen können die kommerziell erhältlichen RNase A-Präparationen als Standard verwendet werden.

- 5 Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigte RNase A weist eine Aktivität von mindestens 40 Kunitz-Einheiten und bevorzugt von mindestens 50 Kunitz-Einheiten auf. Diese Aktivität ist vergleichbar mit den von den Herstellern angegebenen Werten für nicht-rekombinante RNase A.
- 10 Alternativ kann der Aktivitätstest auch mit anderen RNAs bei anderen Temperaturen und über andere Zeiträume hinweg durchgeführt werden. Außerdem ist es natürlich möglich, die Aktivität der RNase A im Rahmen der gewünschten Endanwendung zu testen, z.B. in Form einer Plasmidisolierung.
- 15 Die aufgereinigte RNase A kann entweder als Lyophilisat oder in flüssiger Form aufbewahrt werden. Als Puffer für die flüssige Aufbewahrung eignen sich z.B. Tris-HCl bei einem pH-Wert von 6,8 bis 7,4, ein Phosphatpuffer oder Natriumacetat. Zusätzlich können die Puffer weitere Bestandteile wie Glycerin, Triton X-100, Natriumchlorid oder EDTA enthalten. Wenn Tris-HCl als Puffer verwendet wird,  
20 wird dieses in einer Konzentration von 10 mM bis 250 mM eingesetzt. Bevorzugt wird es in einer Konzentration von 250 mM verwendet. Die RNase A liegt in der Lösung in einer Konzentration von 1 bis 100 mg/ml, bevorzugt 100mg/ml vor.

- Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte RNase A eignet sich für
- 25 alle Anwendungen, in denen üblicherweise RNase A eingesetzt wird, also z.B. für die Isolierung von Plasmid- oder genomischer DNA und rekombinanten Proteinen, den Nachweis von Einzelbasenmutationen oder den Ribonuclease Protection Assay.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele dargestellt, die nicht als Einschränkung zu verstehen sind.

5

Beispiele:

1. Optimierung der für die RNase A kodierenden DNA

- 10 Zur Optimierung der Kodonverwendung wurde zunächst die Proteinsequenz der reifen RNase A, die unter der Accessionnummer AAB35594 in der NCBI-Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) zu finden ist, revers translatiert. Dadurch wurde eine degenerierte DNA-Sequenz erhalten, die anschließend unter Zuhilfenahme öffentlich zugänglicher
- 15 Kodonverwendungstabellen (<http://www.kazusa.or.jp/Kodon/E.html>) für *E. coli* K12 Zellen optimiert wurde. Die DNA-Sequenz für die RNase A wurde an die Kodonverwendung im *E. coli*-Stamm K12 angepasst, indem immer das am häufigsten in diesen Zellen verwendete zur Auswahl stehende Kodon für eine bestimmte Aminosäure verwendet wurde. Bei der Optimierung wurde berücksichtigt,
- 20 dass keine zusätzlichen *Nde*I- oder *Sal*I – Restriktionsstellen generiert wurden, da diese die spätere Klonierung in den Expressionsvektor erschwert hätten. Die so erhaltene cDNA-Sequenz, die als mRAopt bezeichnet wurde und in SEQ ID No. 1 dargestellt ist, wurde bei der Firma Geneart (Regensburg, Deutschland) synthetisiert.
- 25 Das *phoA*-Signalpeptid stammt von der alkalischen Phosphatase aus *Lysobacter enzymogenes* (Accession No. Q05205). Die Sequenz des mutmaßlichen Signalpeptids (29 Aminosäuren) wurde mit einem Applet der Firma Entelechon (<http://www.entelechon.com/>) auf deren Homepage unter Berücksichtigung der

Kodonverwendung in *E. coli* K12 revers translatiert. Abgeleitet von dieser revers translatierten Nukleinsäuresequenz wurden zwei einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (phoA for, phoA rev) hergestellt und über rekombinante PCR mit der kodierenden cDNA mRAopt verbunden.

5

2. Klonierung der optimierten DNA in einen Expressionsvektor und Transformation der *E. coli*-Zellen

10 In einer so genannten primären PCR-Reaktion wurden die beiden für das Signalpeptid kodierenden Oligonukleotide phoA for (SEQ ID No. 3) und phoA rev (SEQ ID No. 4) zu einem Doppelstrang hybridisiert und unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

15 Reaktionsansatz:

10 µl phoA for (10 pmol/µl)

10 µl phoA rev (10 pmol/µl)

10 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (15mM) (Expand High Fidelity PCR System, Fa.  
20 Roche, Mannheim, Deutschland)

4 µl dNTP-Mix (je 2 mM) (Fa. Gibco Life Technologies, Eggenstein,  
Deutschland)

1 µl Polymerase (3,5 Einheiten/µl) (Expand High Fidelity PCR System, Fa.  
Roche, Mannheim, Deutschland)

25 65 µl H<sub>2</sub>O

- 20 -

## PCR-Bedingungen:

1. Schritt: 1 min 95°C
- 5 2. Schritt: 1 min 95°C  
30 sek 50°C  
30 sek 72°C  
25 Zyklen
- 10 3. Schritt: 4 min 72°C
4. Schritt: 4°C

Das Reaktionsprodukt der primären PCR-Reaktion wurde zusammen mit dem Plasmid, das die optimierte DNA-Sequenz enthält (pmRAopt, geliefert von der

15 Firma Geneart), und einem Primer, der die Amplifikation vom 3'-Ende von der RNase A-opt cDNA ermöglicht (5' GTC GAC TAT TAG ACG CTC GCA TC 3'), in einer so genannten rekombinanten PCR-Reaktion mit den folgenden Bedingungen eingesetzt:

## 20 Reaktionsansatz:

- 10 µl pmRAopt (10 ng/µl)
- 10 µl RNase opt 3' Primer für Amplifikation (10 pmol/µl)
- 10 µl primäres PCR-Produkt
- 25 10 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (15 mM) (Expand High Fidelity PCR System, Fa. Roche, Mannheim, Deutschland)
- 8 µl dNTP-Mix (je 2 mM) (Fa. Gibco Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)

- 21 -

1 µl Polymerase (3,5 Einheiten/µl) (Expand High Fidelity PCR System, Fa.  
Roche, Mannheim, Deutschland)

## PCR-Bedingungen:

- 5
- |             |             |      |
|-------------|-------------|------|
| 1. Schritt: | 1 min       | 95°C |
| 2. Schritt: | 1 min       | 95°C |
|             | 30 sek      | 55°C |
| 10          | 45 sek      | 72°C |
|             | 30 Zyklen   |      |
| 3. Schritt: | 4 min       | 72°C |
| 15          | 4. Schritt: | 4°C  |

Im PCR-Produkt, das durch diese Reaktion erhalten wurde, lag die DNA-Sequenz für das Signalpeptid am 5'-Ende der RNase A-opt cDNA.

- 20 Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in den Vektor pCR2.1-TOPO (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Die korrekte Sequenz wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Das klonierte PCR-Produkt wurde anschließend über einen *NdeI/SaII*-Doppelverdau aus dem Vektor herausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt. Parallel hierzu wurde der Vektor pHIP-pelB-
- 25 RNase-opt mit *NdeI/SaII* verdaut, wodurch der linearisierte Vektor pHIP mit *NdeI*- und *SaII*-Enden erhalten wurde. Dieser Vektor wurde ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt. Das *NdeI/SaII*-verdaute *phoA*-RNase A-opt-Fragment wurde in den linearisierten Vektor ligiert und in *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert und

amplifiziert. Aus diesem Stamm wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert und für die Kalziumchlorid-vermittelte Transformation des *E. coli*-Stammes ATCC 23226 (vgl. Sambrook und Russell, *vide supra*) eingesetzt.

- 5 Die hier verwendeten Methoden zur Klonierung der optimierten cDNA sind dem Fachmann wohl bekannt und können zum Beispiel in Sambrook und Russell (2001), *vide supra*, nachgelesen werden.

- Die Karte des Expressionsvektors pHIP ist in Abb. 1 dargestellt, die Sequenz des  
10 Expressionsvektors ist in SEQ ID No. 5 angegeben. Dieser Vektor enthält bereits die hitzeinduzierbare Promotorsequenz und eine multiple Klonierungsstelle, in die über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *NdeI* und *SalI* entsprechende cDNAs kloniert werden können.

15

### 3. Fermentation und Induktion der Bakterien

- Die Bakterien wurden in Kompletmedium (Soja-Pepton (27 g/l), Hefe-Extrakt (14 g/l), NaCl (5 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6 g/l), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g/l), MgSO<sub>4</sub> (0,5 g/l), Glycerin (30  
20 g/l)) bei 30°C kultiviert. In bestimmten Zeitintervallen wurde 1 ml Kulturbrühe in ein zuvor gewogenes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation bei 13000 x g für 3 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Gefäß erneut gewogen. Aus der Differenz zwischen dem Gewicht des Reaktionsgefäßes mit Zellpellet [mg] und dem Gewicht des leeren  
25 Reaktionsgefäßes [mg] dividiert durch das Volumen der Kulturbrühe, aus dem die Zellen pelletiert wurden, lässt sich die Biofeuchtmasse [mg/ml bzw. g/l] bestimmen. Die Bestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Erreichen einer Biofeuchtmasse von 35 bis 50 g/l wurde die Kultivierungstemperatur auf 42°C

erhöht, wodurch die Expression des rekombinanten Proteins induziert wurde. Die Induktionsphase dauerte 17 Stunden.

5     4.     Ernte der Bakterien und Gewinnung der nativen RNase A aus den Inclusion Bodies

Die Zellen wurden nach der Induktionsphase durch Zentrifugation geerntet und in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert, der in einer Menge von 3,75 ml/g  
10 Biofeuchtmasse eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen durch zwei Passagen im Hochdruckhomogenisator (Fa. Niro Soavi, Lübeck, Deutschland) bei einem Druck von  $800 \pm 50$  bar physikalisch aufgeschlossen. Die Inclusion Body-Fraktion wurde durch Zentrifugation ( $11000 \times g$  für 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) geerntet, in  
20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert, wobei der Puffer in einer  
15 Menge von 5g/l Inclusion Bodies eingesetzt wurde, und erneut durch Zentrifugation pelletiert.

Die Inclusion Body-Fraktion wurde in einem denaturierenden Redoxpuffer (5 M Guanidin-HCl, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2 mM Glutathion  
20 (reduziert), 0,2 mM Glutathion (oxidiert), pH 9, eingestellt mit NaOH bzw. HCl) solubilisiert.

Unlösliche Bestandteile der Inclusion Body-Fraktion wurden durch Zentrifugation bzw. Filtration aus dem Ansatz entfernt. Anschließend wurde die optische Dichte der  
25 geklärten Lösung bei 280 nm ( $\text{OD}_{280\text{nm}}$ ) bestimmt.

Die Rückfaltung der denaturierten Proteine erfolgte durch Verdünnung in einem nativen Verdünnungspuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2 mM

Glutathion (reduziert), 0,2 mM Glutathion (oxidiert), mit NaOH bzw. HCl auf pH 9 eingestellt). Das Volumen des Verdünnungspuffers wurde so gewählt, dass sich nach Zugabe der solubilisierten Inclusion Body-Fraktion eine OD<sub>280nm</sub> von 5 in dem Rückfaltungsansatz ergab. Dieser Ansatz wurde für mindestens 15 Stunden leicht  
5 gerührt (150 bis 180 Umdrehungen pro Minute).

#### 5. Ionenaustauschchromatographie

10 Der Rückfaltungsansatz wurde durch Filtration geklärt und anschließend durch Ultrafiltration eingengt und umgepuffert, so dass sich der Ansatz in einem für die nachfolgende Chromatographie geeigneten Puffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8) befand. Der aus der Ultrafiltration erhaltene Ansatz wurde über einen Kationenaustauscher (SP-Sepharose, Firma Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland)  
15 chromatographisch aufgereinigt. Unspezifische Proteine wurden durch Waschen mit etwa drei Säulenvolumen 100 mM Tris-HCl pH 6,8 entfernt. Die Elution erfolgte durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 250 mM Tris-HCl pH 6,8.

#### 20 6. Hitzeinaktivierung und Abfüllung der RNase A

Die produkthaltigen Chromatographie-Fractionen wurden durch Messung der Extinktion bei 280 nm in der Chromatographieanlage identifiziert, vereinigt und für 20 Minuten bei 95°C im Wasserbad hitzebehandelt. Auftretendes Präzipitat wurde  
25 nach der Hitzebehandlung durch Filtration oder Zentrifugation entfernt. Die Probe wurde durch Ultrafiltration eingengt und die RNase A-Lösung durch Zugabe von 250 mM Tris-HCl pH 6,8 auf eine Endkonzentration von 100 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und abgefüllt.

## 7. Analyse der aufgereinigten RNase A

Die rekombinante, aufgereinigte RNase A wurde qualitativ durch SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung, wie sie in Sambrook  
5 und Russell (2001), *vide supra*, beschrieben ist, analysiert.

In Abbildung 2 ist die Analyse der Protein-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung bzw. Induktion gezeigt. Die Expression der rekombinanten RNase A ist bereits 1,5 Stunden nach der Induktion nachweisbar und steigt bis 18 Stunden  
10 nach der Induktion an.

Abbildung 3 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der RNase A nach den einzelnen Aufreinigungsschritten. Mit der oben beschriebenen Abfolge der Aufreinigungsschritte wird ausschließlich die RNase A aufgereinigt.

15

Die Konzentration der aufgereinigten RNase A wurde kolorimetrisch nach Bradford, M.M. ((1976) Anal. Biochem. 72: 248-254) bestimmt.

Zur Analyse der RNase-Aktivität wurden unterschiedliche Mengen der nach dem  
20 erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten RNase A mit 10 µl Hefe-Gesamt-RNA (10 µg/µl in 100 mM Natriumacetat pH 5,0) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 5 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Zum Vergleich wurde eine kommerziell erhältliche RNase A parallel analysiert. Die behandelten Proben wurden mit 4 µl Beladungspuffer gemischt, auf einem 1% Agarosegel in 1x TAE  
25 elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zwischen den beiden RNase A-Präparationen war kein signifikanter Unterschied erkennbar (vgl. Abb. 4a).

- Außerdem wurde sowohl die RNase A, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden war, als auch zwei verschiedene kommerziell erhältliche RNase A-Präparationen zur Aufreinigung zweier unterschiedlicher Plasmide verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Kulturen über Nacht in dYT-Medium mit
- 5 Kanamycin (50µg/ml) bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Von jeder Kultur wurden pro Ansatz 1,5 ml in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge für 3 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute pelletiert. Die Pellets wurden in je 200 µl Puffer 1 (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland; 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 200 µl
- 10 Puffer 2 (Fa. Qiagen; 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) gemischt und für 3-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer 3 (Fa. Qiagen; 3 M Kaliumacetat pH 5,5) zugegeben, die Proben durch Invertieren gemischt und für 5 min in einer Tischzentrifuge bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand (500 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von jedem Ansatz
- 15 wurden 10 µl auf ein 1,2 % Agarosegel in 1x TAE aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt. Dabei konnte kein Unterschied hinsichtlich der RNase A-Aktivität oder der DNA-Konformation in den Ansätzen mit der erfindungsgemäßen RNase A und den kommerziellen RNase A-Präparationen festgestellt werden (vgl. Abb. 4b).

Abbildungen

1. Karte des pHIP-Expressionsvektors  
5 Die Komponenten des Expressionsvektors sowie die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind markiert.
- 10 2. Untersuchung der Kinetik der Expression der rekombinanten RNase A in den verwendeten *E. coli*-Zellen durch SDS-PAGE-Analyse
- 15 1: Prestained marker (Firma NEB Beverly, MA, USA), 2: 1h vor Induktion, 3: 0,5h vor Induktion, 4: Induktion, 5: 0,5 h nach Induktion, 6: 1,5 h nach Induktion, 7: 2,5 h nach Induktion, 8: 18h nach Induktion
3. SDS-PAGE-Analyse der RNase A nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten  
20
- 25 1: Prestained marker (Firma NEB, Beverly, MA, USA), 2: Zellernte, 3: lösliche Proteine, 4: Überstand nach Waschen der Inclusion Body-Fraktion, 5: solubilisierte Inclusion Body-Fraktion, 6: nach Rückfaltung, 7: nach Diafiltration, 8: Durchfluß bei Chromatographie (= ungebundenes Material), 9: Eluat 1, 10: Eluat 2, 11: Eluat 3, 12: kommerzielle, bovine RNase A

- 28 -

4. Aktivitätstests der aufgereinigten RNase A

a) Verdau von RNA

- 1, 15: 1 kb Größenmarker, 2-7; unterschiedliche Mengen kommerzieller, boviner  
5 RNase A (von 1 µg bis 0,025 µg), 8: Kontrolle ohne RNase A, 9-14: unterschiedliche  
Mengen rekombinanter, boviner RNase A (von 1 µg bis 0,025 µg)

b) RNase-A-Aktivität während der Plasmid-Isolierung

- 10 M: 1 kb Größenmarker, 1: ohne RNase A, 2: bovine RNase A (Fa. A), 3: bovine  
RNase A (Fa. B), 4: rekombinante RNase A

## PATENTANSPRÜCHE

- 5           1.     Verfahren zur Herstellung von rekombinanter RNase A in *E. coli*,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine RNase A bovinen Ursprungs  
kodiert und die an die Kodonverwendung in *E. coli* angepasst wurde.
- 10           2.     Verfahren nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz an die  
Kodonverwendung in *E. coli* K12 angepasst ist.
3.     Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz an das  
am häufigsten in *E. coli* verwendete Kodon angepasst ist.
- 15           4.     Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die DNA-  
Sequenz der in SEQ ID. No. 1 angegebenen DNA-Sequenz oder einer zu der in SEQ  
ID. No. 1 angegebenen DNA-Sequenz zu mindestens 90 % identischen Sequenz  
entspricht.
- 20           5.     Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz unter  
Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit einzelner Kodons angepasst ist.
6.     Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 5, wobei die DNA-  
25 Sequenz der in SEQ ID. No. 2 angegebenen DNA-Sequenz oder einer zu der in SEQ  
ID. No. 2 angegebenen DNA-Sequenz zu mindestens 90 % identischen Sequenz  
entspricht.

- 30 -

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die RNase A in Fusion mit einem Signalpeptid exprimiert wird, das den Transport in den periplasmatischen Raum steuert.
- 5        8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei dem Signalpeptid um das Signalpeptid der alkalischen Phosphatase (phoA) handelt.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Expression der RNase A unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht.
- 10       10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei es sich bei dem Promotor um einen hitzeinduzierbaren Promotor handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Induktion der
- 15 Genexpression am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die Induktion der Genexpression für einen Zeitraum von 14 bis 20 Stunden erfolgt.
- 20       13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die RNase A Inclusion Bodies bildet.
14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Verfahren weiter umfasst die Gewinnung der RNase A aus den *E. coli*-Zellen bzw.
- 25 dem Kulturmedium, ggf. unter Solubilisierung und Rückfaltung der RNase A.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei zur Solubilisierung Guanidin-HCl als Denaturierungsmittel verwendet wird.

- 31 -

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, wobei zur Rückfaltung  
reduziertes und oxidiertes Glutathion verwendet wird.

5 17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das  
Verfahren weiter umfasst eine chromatographische Aufreinigung der RNase A.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird.

10

19. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die  
Ausbeute an RNase A mehr als 100 mg RNase A pro Liter Kulturmedium beträgt.

20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die  
15 Ausbeute an RNase A mehr als 3 mg RNase A pro Gramm Biofeuchtmasse beträgt.

21. Rekombinante RNase A, hergestellt nach einem Verfahren nach  
einem der Ansprüche 1 bis 20.

20 22. *E. coli*-Zellkultur, enthaltend mindestens 0,2 g RNase A pro Liter  
Kulturmedium.

23. Nukleinsäuremolekül, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß  
SEQ ID No. 1.

25

24. Nukleinsäuremolekül, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß  
SEQ ID No. 2.

- 32 -

25. Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Bestandteile in 5'-3'-Reihenfolge:

- einen in *E. coli* aktiven Promotor,
- ggf. eine für ein Signalpeptid im Sinne von Anspruch 7 oder 8 kodierende Sequenz,
- 5 - eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder No. 2.

26. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder No. 2 zur Herstellung von rekombinanter RNase A.

- 10        27. Verwendung der RNase A nach Anspruch 21 in der Reinigung von DNA und Proteinen.

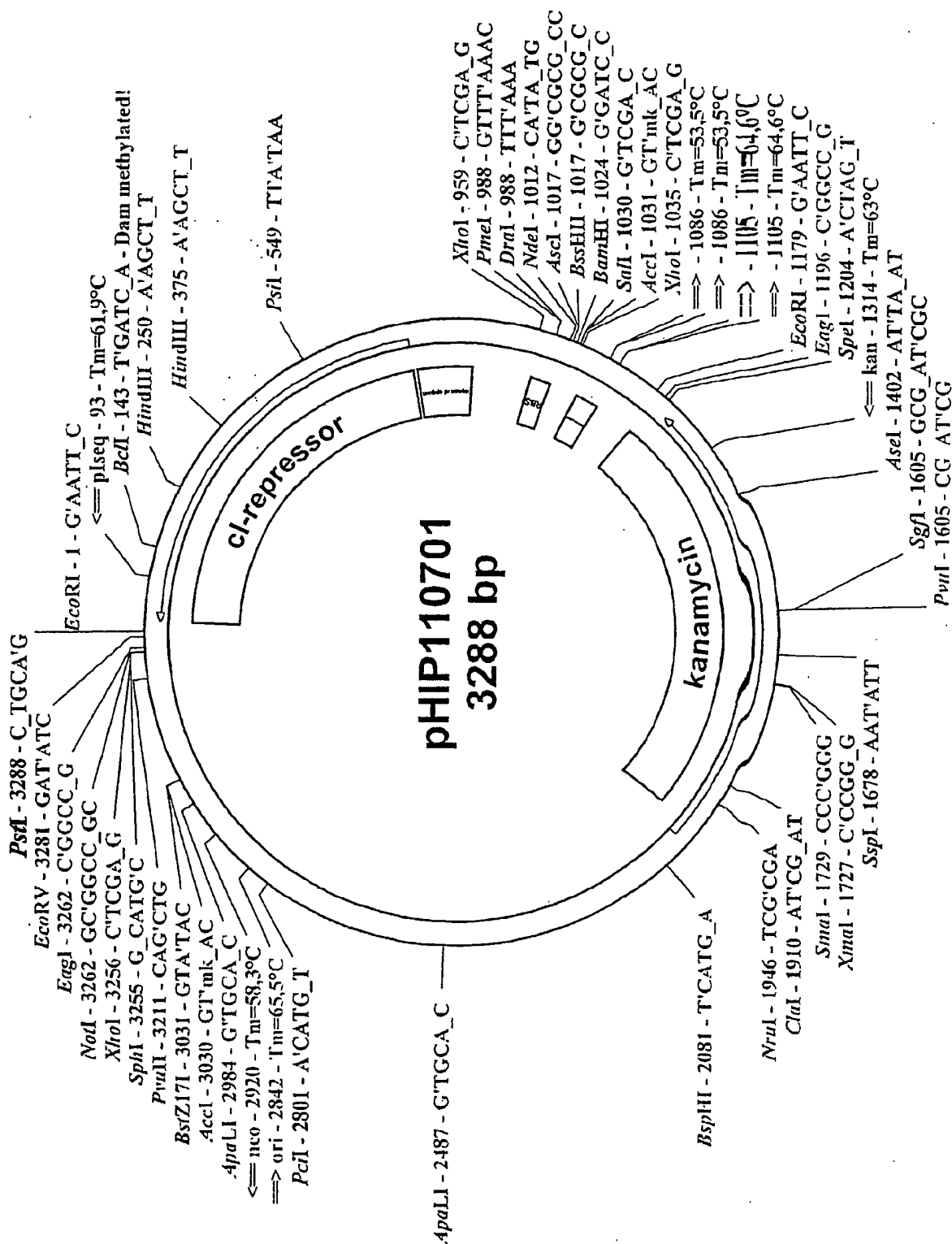


Abb. 1

2 / 3

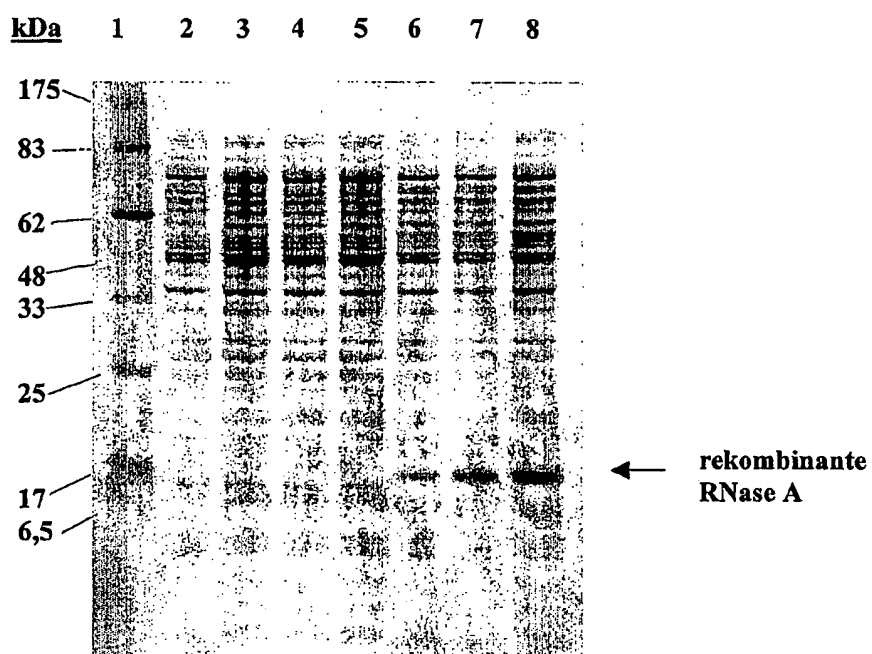


Abb. 2

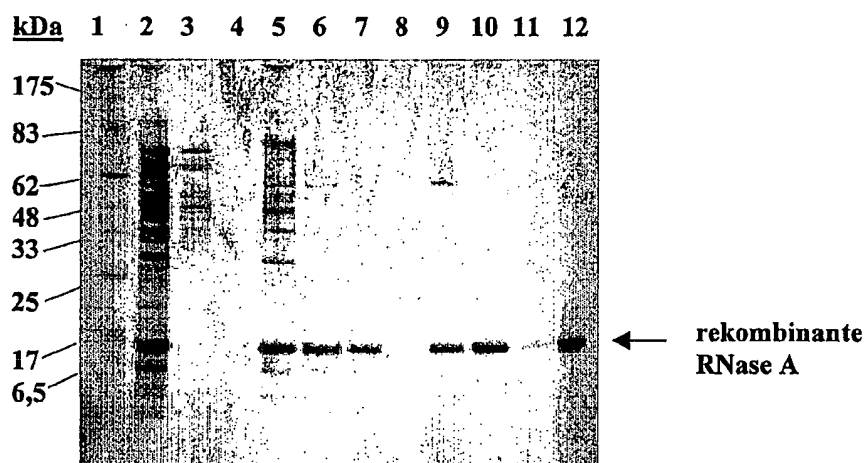


Abb. 3

Best Available Copy

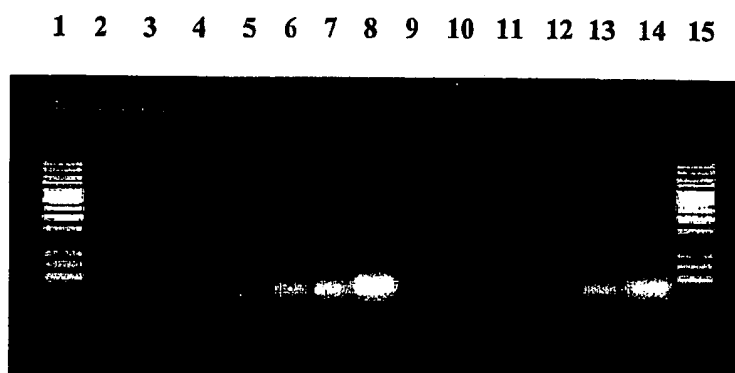


Abb. 4a

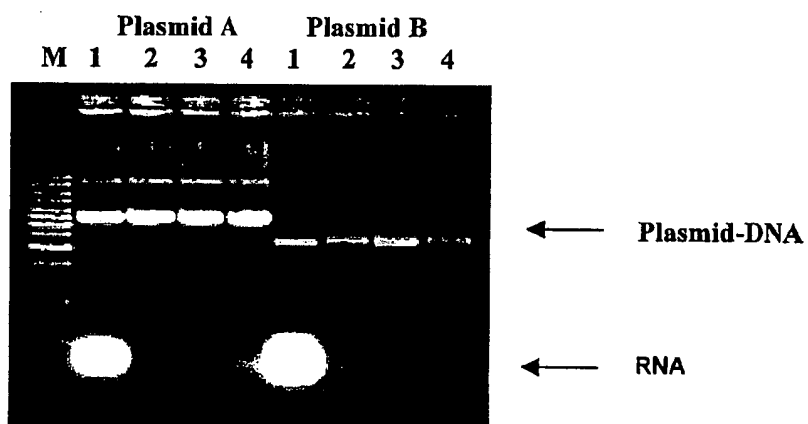


Abb. 4b

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Strathmann Biotec AG

<120> Verfahren zur Herstellung von rekombinanter RNase A

<130> C 7646

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 389

<212> DNA

<213> Bos sp.

<400> 1

```
catatgaaag aaacggctgc ggcgaaattt gaacgccagc acatggatag cagcaccagc 60
gcggcgagca gcagcaacta ctgtaaccag atgatgaaaa gccgtaactt aaccaagat 120
cgttgtaaac cgggtgaacac ctttgtgcac gaaagcttag cggatgtgca ggcggtgtgc 180
agccagaaaa acgtggcgtg taaaaacgga cagaccaact gctatcagag ctacagcacc 240
atgagcatta ccgattgccg cgaaaccggg agcagcaa atccgaactg tgcgtacaaa 300
accacccagg cgaacaaaca tattattgtg gcgtgtgaag gaaaccgta tgtgccggtg 360
cattttgatg cgagcgtcta atagtcgac 389
```

<210> 2

<211> 389

<212> DNA

<213> Bos sp.

<400> 2

```
catatgaaag aaacggctgc ggcgaaattt gagcgccagc acatggacag ctccaccagc 60
gctgcctcga gctcgaatta ctgtaaccag atgatgaagt ctcgtaacct gactaaagac 120
cgttgtgaagc cgggtgaacac gttcgtacac gaaagttag cagatgtaca ggccgtttgc 180
agtcagaaaa atgtggcatg taaaaacgga caaacgaatt gctatcaaag ttactctaca 240
atgagcatta ccgattgccg cgaaaccggg tcctcaaaat atcctaattg tgccacaaa 300
accactcagg caaacaacaa tattatcgtg gcgtgcgagg gcaaccgta tgtcccagtt 360
cactttgatg cgtcagtcta atagtcgac 389
```

<210> 3

<211> 69

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 3

```
catatgaacc ttagtccaag cagaacaccg atttgcgcgg cgctggctgc ggccttgctc 60
ggagcagct                                         69
```

<210> 4

<211> 62

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4

```
ttcgccgcag ccgtttcttt cgcatgggcc ggggccagtg cagctgctcc gagcaaggcc 60
gc                                              62
```

<210> 5

<211> 3288

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pHIP-Vektor

<400> 5

```
gaattcgccc ttggggatca gccaaacgtc tottcaggcc actgactagc gataactttc 60
cccacaacgg aacaactctc attgcatggg atcattgggt actgtgggtt tagtggttgt 120
aaaaacacct gaccgctatc cctgatcagt ttcttgaagg taaactcatc acccccaagt 180
ctggctatgc agaaatcacc tggtcaaca gcctgctcag ggtcaacgag aattaacatt 240
ccgtcaggaa agcttggtt ggagcctgtt ggtgcggtca tggaattacc ttcaacctca 300
agccagaatg cagaatcact ggcttttttg gttgtgctta cccatctctc cgcacacct 360
ttggtaaaag ttctaagctt aggtgagaac atccctgcct gaacatgaga aaaaacaggg 420
tactcactac cacttctaag tgacggctgc atactaaccg cttcatacat ctgtagatt 480
tctctggcga ttgaagggt aaattcttca acgctaactt tgagaatttt tgtaagcaat 540
gcggcggttat aagcatttaa tgcattgatg ccattaaata aagcaccaac gcctgactgc 600
cccatcccca tcttgtctgc gacagattcc tgggataagc caagttcatt tttctttttt 660
tcataaattg ctttaaggcg acgtgcgtcc tcaagctgct cttgtgttaa tggtttcttt 720
tttgtgtcga tacgttaaata ctatcaccgc aagggataaa tatctaacac cgtgcgtgtt 780
gactatttta cctctggcgg tgataatggt tgcattgtact aaggagggtg tatggaacaa 840
cgcataaccc tgaaagatta tgcaatgcgc tttgggcaaa ccaagacagc taaagatcaa 900
gaatgttgat cttcagtgtt tcgcctgtct gttttgcacc ggaatttttg agttctgcct 960
```

cgagtaattt accaactacta ctacgtttta actgaaacaa actggagact catatggcgc 1020  
 gccggatccg tcgactcgag ttcgacctcg aaagcaagct gataaaccca tacaattaaa 1080  
 ggctcccttt ggagcccttt tttttggaga ttttcaacgt gaaaaaatta ttattcgcaa 1140  
 ttccttttagt tgttcctttc tttctcacc ccaaggcgga attccagcac actggcggcc 1200  
 gttactagtg gatcaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 1260  
 tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 1320  
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc 1380  
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtaaaa aataagggtta tcaagtgaga 1440  
 aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaattggcaa aagtttatgc atttctttcc 1500  
 agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 1560  
 cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 1620  
 aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1680  
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1740  
 tggtagagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatgggc ggaagaggca 1800  
 taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1860  
 ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1920  
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1980  
 tgttggaatt taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 2040  
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 2100  
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 2160  
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 2220  
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 2280  
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 2340  
 aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 2400  
 agtgggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 2460  
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 2520  
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 2580  
 aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 2640  
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2700  
 cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2760  
 gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2820  
 tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2880  
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcgaggaa cgggaagagcg cctgatgcgg 2940  
 tatcttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca atggtgact ctgagtacaa 3000  
 tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt atactactcc ctatcgctac gtgactgggt 3060  
 catggctgcg cccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct 3120  
 cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt 3180  
 ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgaggca gctgcggtaa agctcatcag cgtggctcgtg 3240  
 aagcctagat gcatgctcga gcggccgcca gtgtgatgga tatctgca 3288

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003063

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N9/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, Sequence Search, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OKOROKOV ANDREI L ET AL: "An efficient system for active bovine pancreatic ribonuclease expression in Escherichia coli" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 6, no. 4, 1995, pages 472-480, XP002336571 ISSN: 1046-5928 the whole document	1-27
Y	LELAND PETER A ET AL: "The ribonucleolytic activity of angiogenin" BIOCHEMISTRY, vol. 41, no. 4, 29 January 2002 (2002-01-29), pages 1343-1350, XP002336572 ISSN: 0006-2960 the whole document	1-27
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 2005

Date of mailing of the international search report

16/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bassias, I

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROYTRAKUL SITTIRUK ET AL: "A rapid and simple method for construction and expression of a synthetic human growth hormone gene in Escherichia coli" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 34, no. 6, 30 November 2001 (2001-11-30), pages 502-508, XP002336573 ISSN: 1225-8687 the whole document	1-27
A	RAINES R. T.: "Ribonuclease A" CHEMICAL REVIEWS, vol. 98, no. 2, 1998, pages 1045-1065, XP002336574	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003063

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N9/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, Sequence Search, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	OKOROKOV ANDREI L ET AL: "An efficient system for active bovine pancreatic ribonuclease expression in Escherichia coli" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 6, Nr. 4, 1995, Seiten 472-480, XP002336571 ISSN: 1046-5928 das ganze Dokument	1-27
Y	LELAND PETER A ET AL: "The ribonucleolytic activity of angiogenin" BIOCHEMISTRY, Bd. 41, Nr. 4, 29. Januar 2002 (2002-01-29), Seiten 1343-1350, XP002336572 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1-27

-/--

<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		<p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>	
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche  <b>18. Juli 2005</b>		Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts  <b>16/08/2005</b>	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Bassias, I</b>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003063

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ROYTRAKUL SITTIRUK ET AL: "A rapid and simple method for construction and expression of a synthetic human growth hormone gene in Escherichia coli"</p> <p>JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY,</p> <p>Bd. 34, Nr. 6,</p> <p>30. November 2001 (2001-11-30), Seiten 502-508, XP002336573</p> <p>ISSN: 1225-8687</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>RAINES R. T.: "Ribonuclease A"</p> <p>CHEMICAL REVIEWS,</p> <p>Bd. 98, Nr. 2, 1998, Seiten 1045-1065, XP002336574</p> <p>-----</p>	

10/593663

IAP9/Rec'd PCT/PTO 20 SEP 2006

Sequence Listing.txt  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Strathmann Biotec GmbH &amp; Co.KG

&lt;120&gt; Method for producing recombinant RNase A

&lt;130&gt; C 7646/RN

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 389

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos sp.

&lt;400&gt; 1

catatgaaag	aaacggctgc	ggcgaaattt	gaacgccagc	acatggatag	cagcaccagc	60
gcggcgagca	gcagcaacta	ctgtaaccag	atgatgaaaa	gccgtaactt	aaccaaagat	120
cgttgtaaac	cggtgaacac	ctttgtgcac	gaaagcttag	cggtatgtgc	ggcgggtgtgc	180
agccagaaaa	acgtggcgtg	taaaaacgga	cagaccaact	gctatcagag	ctacagcacc	240
atgagcatta	ccgattgccg	cgaaaccggt	agcagcaaat	atccgaactg	tgcgtacaaa	300
accacccagg	cgaacaaaca	tattattgtg	gcgtgtgaag	gaaacccgta	tgtgccggtg	360
cattttgatg	cgagcgtcta	atagtcgac				389

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 389

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos sp.

&lt;400&gt; 2

catatgaaag	aaacggctgc	ggcgaaattt	gagcgccagc	acatggacag	ctccaccagc	60
gctgcctcga	gctcgaatta	ctgtaaccag	atgatgaagt	ctcgtaacct	gactaaagac	120
cgttgtaagc	cggtgaacac	gttcgtacac	gaaagttag	cagatgtaca	ggccgtttgc	180
agtcagaaaa	atgtggcatg	taaaaacgga	caaacgaatt	gctatcaaag	ttactctaca	240
atgagcatta	ccgattgccg	cgaaaccggt	tcctcaaaat	atcctaattg	tgcctacaaa	300
accactcagg	caaacaaaca	tattatcgtg	gcgtgcgagg	gcaacccgta	tgtcccagtt	360
cactttgatg	cgtcagtcta	atagtcgac				389

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 69

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of the artificial sequence: Primer

&lt;400&gt; 3

catatgaacc	ttagtccaag	cagaacaccg	atttgcgcgg	cgctggctgc	ggccttgctc	60
ggagcagct						69

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

# Sequence Listing.txt

<220>

<223> Description of the artificial sequence: Primer

<400> 4

ttcgccgcag ccgtttcttt cgcattgggccc ggggccagtg cagctgctcc gagcaaggcc 60  
gc 62

<210> 5

<211> 3288

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: pHIP-Vector

<400> 5

gaattcgccc ttgggggatca gccaaacgtc tcttcaggcc actgactagc gataactttc 60  
cccacaacgg aacaactctc attgcatggg atcattgggt actgtgggtt tagtggttgt 120  
aaaaacacct gaccgctatc cctgatcagt ttcttgaagg taaactcatc acccccaagt 180  
ctggctatgc agaaatcacc tggctcaaca gcctgctcag ggtcaacgag aattaacatt 240  
ccgtcaggaa agcttggcct ggagcctgtt ggtgcggtca tgggaattacc ttcaacctca 300  
agccagaatg cagaatcact ggcttttttg gttgtgctta cccatctctc cgcataccct 360  
ttggtaaagg ttctaagcct aggtgagaac atcccctgcct gaacatgaga aaaaacaggg 420  
tactcatact cacttctaag tgacggctgc atactaacgg cttcatacat ctctagatt 480  
tctctggcga ttgaagggtt aaattcttca acgctaactt tgagaatttt tgtaagcaat 540  
gcggcgttat aagcatttaa tgcattgatg ccattaaata aagcaccaac gcctgactgc 600  
cccattccca tcttgtctgc gacagattcc tgggataagc caagttcatt tttctttttt 660  
tcataaattg ctttaaggcg acgtgcgtcc tcaagctgct cttgtgttaa tggtttcttt 720  
tttgtgctca tacgttaaat ctatcacgcg aagggataaa tatctaaccac cgtgcgttgt 780  
gactatttta cctctggcgg tgataatggt tgcatgtact aaggaggttg tatggaacaa 840  
cgcataaccc tgaaagatta tgcaatgcgc tttgggcaaa ccaagacagc taaagatcaa 900  
gaatgttgat cttcagtggt tcgcctgtct gttttgcacc ggaatttttg agttctgcct 960  
cgagtaattt accaacata ctacgtttta actgaaacaa actggagact catatggcgc 1020  
ggcgatccg tcgactcgag ttcgacctcg aaagcaagct gataaaccga tacaattaaa 1080  
ggctcctttt ggagcctttt tttttggaga ttttcaacgt gaaaaaatta ttattcgcaa 1140  
ttcctttagt tgttcttttc tattctcacc ccaagggcga attccagcac actggcggcc 1200  
gttactagt gatcaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat 1260  
tcataatcagg attatcaata ccattttttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 1320  
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gctctggta tcggtctgcg attccgactc 1380  
gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 1440  
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaattggcaa aagtttatgc atttctttcc 1500  
agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 1560  
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaaatc gcgatcgctg ttaaaaggac 1620  
aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1680  
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttccc gggatcgcg 1740  
tggtgagtaa ccattgcata tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1800  
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1860  
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1920  
tcgcacctga ttgcccagca ttatcgcgag cccattttata cccatataaa tcagcatcca 1980  
tggttgaatt taatcgcggc cttagagcaag acgtttccc tgaatatgg ctcataacac 2040  
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 2100  
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 2160  
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 2220  
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 2280  
agagcgcgaga taccaaatat tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 2340  
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc 2400  
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 2460  
cagcggctcg gctgaacggg ggggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac 2520  
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 2580  
aaggcgagaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 2640  
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2700  
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2760

# Sequence listing.txt

gccttttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtaa	2820
tcccctgatt	ctgtggataa	ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	2880
agccgaacga	ccgagcgcag	cgagtcagtg	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	2940
tattttctcc	ttacgcatct	gtgcggtatt	tcacaccgca	atggtgcact	ctcagtacaa	3000
tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagt	atacactccg	ctatcgctac	gtgactgggt	3060
catggctgcg	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	3120
cccggcatcc	gcttacagac	aagctgtgac	cgtctccggg	agctgcatgt	gtcagagggt	3180
ttaccgtca	tcaccgaaac	gcgcgaggca	gctgcggtaa	agctcatcag	cgtggtcgtg	3240
aagcctagat	gcatgctcga	gcggccgcca	gtgtgatgga	tatctgca		3288